

# WPŁYW MAKROFAGÓW NA PROCES DEGRADACJI POLI (KWASU L- MLEKOWEGO)

BARBARA CZAJKOWSKA\*, JOANNA KOWAL\*\*

\*COLLEGIUM MEDICUM, UNIwersYTET JagIELLOŃSKI, KRAKÓW

\*\*WYDZIAŁ CHEMII, UNIwersYTET JagIELLOŃSKI, KRAKÓW

## Streszczenie

*Badano proces degradacji kwasu poli(L-mlekowego) w obecności makrofagów (Mf) oraz biogodność układu PLLA+Mf. Postęp degradacji oceniano na podstawie pomiarów lepkości polimeru, analizy widm w zakresie podczerwieni oraz oznaczenia ilości uwolnionego kwasu mlekowego. Porównano żywotność makrofagów oraz sekrecję cytokin w hodowlach makrofagów w nieobecności biomateriału oraz w układach zawierających filmy PLLA i makrofagi. Stwierdzono wzrost szybkości degradacji PLLA w obecności makrofagów oraz zadowalającą biogodność poli(kwasu L-mlekowego) i komórek linii makrofagowej.*

**Słowa kluczowe:** makrofagi, kwas poli(L-mlekowy), degradacja polimeru

## Wprowadzenie

Poli(kwas mlekowy) należy do grupy polimerów biodegradowalnych otrzymywanych z  $\alpha$ -hydroksykwasów. Polimery te były przedmiotem wielu badań ze względu na ich zastosowania do otrzymywania materiałów szewnych [1,2], implantów w chirurgii i ortopedii [3-7] oraz nośników leków [8,9]. Poli( $\alpha$ -hydroksykwas) ulegają degradacji w organizmach żywych tworząc endogenne proste  $\alpha$ -hydroksykwasy. Kinetyka tego procesu warunkuje w sposób istotny stosowalność biomateriału z uwagi na fakt, iż szybkość procesu degradacji powinna być dostosowana do rodzaju procesu rekonstrukcyjnego, w którym materiał jest wykorzystywany. Na proces degradacji PLLA wpływa wiele czynników; do najistotniejszych należą: krystaliczność polimeru [10], jego masa molowa [11], pH i temperatura otoczenia [12-16]. Jak dotąd jednakże nie wyjaśniono w pełni mechanizmu degradacji PLLA in vivo ze względu na jego złożoność i tworzenie produktów endogennych, które mogą wpływać na proces degradacji. Badania prowadzone in vitro polegają na selektywnym traktowaniu próbek PLLA roztworami symulującymi płyny ustrojowe, a także poddawanie materiału działaniu różnego rodzaju komórek, takich jak hepatocyty, fibroblasty, osteoblasty, komórki mięśniowe [17-19]. Wykazano między innymi, że próbki PLLA ulegają degradacji heterogenicznej: jest ona szybsza wewnątrz próbki niż na powierzchni [14].

Celem niniejszej pracy było przeprowadzenie badań in vitro nad wpływem jednego rodzaju komórek, mianowicie makrofagów, na proces degradacji poli(kwasu L-mlekowego). Makrofagi należą do grupy komórek odgrywających zasadniczą rolę w obronie immunologicznej zarówno swoistej jak i nieswoistej. We wczesnych stadiach reakcji zapalnych migrują one z naczyń krwionośnych do miejsca objętego stanem zapalnym i ulegają aktywacji uwalniając wiele silnych mediatorów biologicznych, takich jak cytokiny i interleukiny, na przykład IL-6 i TNF- $\alpha$  [20]. Makrofagi mają też zdolność do fagocytozy i trawienia obcych substancji,

# THE EFFECT OF MACROPHAGES ON THE PROCESS OF POLY(L-LACTIC ACID) DEGRADATION

...23...

BARBARA CZAJKOWSKA\*, JOANNA KOWAL\*\*

\*COLLEGIUM MEDICUM, JAGIELLONIAN UNIVERSITY, KRAKÓW, POLAND

\*\*FACULTY OF CHEMISTRY, JAGIELLONIAN UNIVERSITY, KRAKÓW, POLAND

## Abstract

*The process of degradation of poly(L-lactic acid) (PLLA) in the presence of macrophages (Mf) and the biocompatibility of the system PLLA+Mf was studied. The progress of the degradation was monitored by the measurements of polymer viscosity and IR spectra of the films as well as the concentration of the released lactic acid. The viability of macrophages and the secretion of cytokines were compared for the systems containing PLLA films immersed in macrophage suspension and macrophages cultured without the polymer. The results confirm the increase in the rate of PLLA degradation in the presence of macrophages as well as the satisfactory biocompatibility of poly(L-lactic acid) and macrophage cells.*

**Key words:** macrophages, poly(L-lactic acid), polymer degradation

## Introduction

Poly(lactic acid) belongs to the class of biodegradable polymers derived from  $\alpha$ -hydroxyacids. These polymers have been widely investigated for the development of surgical suture materials [1,2], orthopaedic and reconstructive implants in trauma and bone surgery [3-7], as well as they are used as controlled drug delivery devices [8,9]. Poly( $\alpha$ -hydroxyacids) degrade in living organisms forming endogenic simple hydroxyacids and the kinetics of this process is the most essential parameter determining their usability. This is due to the fact that the rate of degradation should be correlated with the reconstructing process, for which they are used. There are many physical and chemical factors determining the process of poly(lactic acid) degradation, the most essential being: the crystallinity of the polymer [10], its molecular weight [11], pH and the temperature of environment [12-16]. So far the mechanism of PLLA degradation in vivo has not been established because of its complexity and the formation of various endogenic products, which can affect the degradation process. The studies carried out in vitro are based on the selective treatment of PLLA samples with various solutions simulating body fluids and/or contacting them with different types of cells such as hepatocytes, fibroblasts, osteoblasts, muscle cells [17-19]. It has been found for example [14] that thick samples of PLLA undergo the heterogeneous degradation: faster inside the sample than at the surface [14].

The aim of this study was to determine in vitro the influence of one type of cells, macrophages, on the degradation of poly(L-lactic acid). Macrophages (Mf) are multipotential cells of innate and adaptive immune system. In early inflammatory reactions they migrate out of the capillaries to



kóre dostały się do ustroju. Gdy rozmiary materiału są zbyt duże wysyłają one mediatory na zewnątrz. Zastosowanie biomateriału *in vivo* jest zwykle związane z postępowaniem chirurgicznym; jego następstwem jest kontakt makrofagów z tym materiałem. Wydawało się interesującym stwierdzenie w jaki sposób komórki te reagują na PLLA - w tym celu oceniono żywotność makrofagów i sekrecję IL-6 i TNF- $\alpha$ . Równolegle badano proces degradacji PLLA w obecności makrofagów.

## Materialy

Badany biomateriał: poli(kwas L-mlekowy) (PLLA) (ICN Bio-medicals Inc.).

Komórki: makrofagi mysie linii J774, hodowane w RPMI 1640 i 10% płodowej surowicy cielęcej (FCS) (GIBCO Laboratories, Grand Island, NY).

Odczynniki:

Liposacharyd LPS (*Escherichia coli* B 4.01) (DIFCO), barwnik MTT: bromek 3-[4,5-dimetylotiazolo-2-ylo]-2,5-difenylo-tetrazoliowy, zestaw diagnostyczny do oznaczania mleczanu (Sigma Diagnostic, Procedure No.826-U.V.).

Przeciwciała i standardy do oznaczania cytokin:

przeciwciała: szczurze anty mysie IL-6 (Genzyme), bioty-nylowane szczurze anty mysie IL-6 (Pharmingen), chomi-cze anty mysie TNF $\alpha$  ( Genzyme), poliklonalne królicze anty mysie TNF $\alpha$  ( Genzyme) , sprzężone z peroksydazą kozie anty królicze IgG ( Sigma),

standardy: rekombinowana mysia IL-6 (Prepro Tech); re-kombinowany mysie TNF $\alpha$  (Genzyme).

## Metody

Stężenie kwasu mlekowego w supernatantach oznaczono przy użyciu zestawu diagnostycznego firmy Sigma do ilościowego oznaczania mleczanu. Stężenie cytokin (TNF $\alpha$  i IL-6) wyznaczono metodą ELISA. W celu określenia żywotności makrofagów zastosowano zmodyfikowaną metodę kolorymetryczną Denizota z użyciem barwnika MTT [21]. Widma IR filmów polimerowych rejestrowano przy pomocy spektrofotometru IFS 48 (Bruker), do rejestracji widm w zakresie UV stosowano spektrofotometr UV VIS 8452A Hewlett Packard. Intensywność padającego promieniowania o długości fali  $\lambda = 254$  nm wyznaczono przy pomocy radiometru VLX-3W z sensorem C-254 (Vilber Lourmat, France). Lepkość roztworów polimerowych w chloroformie oznaczano w viskozymetrze kapilarnym w temperaturze  $30 \pm 0,1^\circ\text{C}$ .

## Wyniki i dyskusja

Próbki PLLA przygotowywano w postaci filmów o średnicy 2,0 cm i grubości 50 - 150  $\mu\text{m}$ . Uzyskano je rozpuszczając naważkę PLLA w  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , wylanie roztworu na gładką płytkę szklaną i powolne odparowanie rozpuszczalnika. Filmy przechowywano w cieplarni w temperaturze  $37^\circ\text{C}$  przez dwa dni.

Przed rozpoczęciem inkubacji z komórkami próbki sterylizowano w laminarze wyposażonym w lampę rtęciową niskociśnieniową (Heraeus), emitującą promieniowanie o długości fali  $\lambda = 254$  nm o intensywności  $0,97 \text{ mW} \times \text{cm}^{-2}$  ( $4 \times 10^{-9}$  moli fotonów  $\times \text{s}^{-1} \times \text{cm}^{-2}$ ). Na podstawie testów bakteriologicznych wykazano, że sterylizacja była dokonana po 6 minutach naświetlania próbki w laminarze.

W celu sprawdzenia stabilności fotochemicznej filmów PLLA poddano je długotrwałemu naświetlaniu. Naświetlania prowadzono w powietrzu pod ciśnieniem atmosferycznym promieniowaniem o długości fali  $\lambda = 254$ , wyizolowanym z widma średniociśnieniowej lampy rtęciowej przy pomocy filtru

the place of the inflammation and become activated. Activated macrophages release many strong biological mediators including cytokines and interleukins, IL-6 and TNF $\alpha$ , which affect surrounding tissues [20]. When in contact with a material of appropriate size macrophage can phagocytize it or, in the case when it is too large, they secrete the mediators outside. Any application of a biomaterial *in vivo* is almost always connected with a surgical action, which is followed by the contact of macrophages with this material. It seemed to be important and interesting to find out how these cells respond to PLLA. Thus the viability of macrophages and the secretion of TNF $\alpha$  and IL-6 were examined. In the parallel investigation the process of PLLA degradation in the presence of macrophages was monitored.

## Materials

Investigated biomaterial: poly(L-lactic acid) (PLLA) (ICN Biomedicals Inc., USA).

Cells: mouse macrophage line J774 cultured in RPMI 1640 with fetal calf serum (FCS) (GIBCO Laboratories, Grand Island, NY).

Reagents: standard activation reagent: LPS (*Escherichia coli* B 4.01) (DIFCO); 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (Sigma), diagnostic kit for the quantitative determination of lactate (Sigma).

Antibodies and standards used for cytokine assays: rat anti-IL-6 (Genzyme), biotinylated rat anti-IL-6 mAbs (Pharmingen), recombinant mouse IL-6 (Prepro Tech); hamster anti-murine TNF $\alpha$  (Genzyme), rabbit polyclonal anti-murine TNF $\alpha$  (Genzyme), peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG (Sigma), recombinant murine TNF $\alpha$  (Genzyme).

## Methods

Diagnostic kit for the quantitative determination of lactate, Sigma Diagnostic, Procedure No. 826-U.V. was applied to evaluate the concentration of lactic acid in supernatants [21]. The concentration of cytokines (TNF $\alpha$  and IL-6) was estimated by ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) test. The viability of the cells was determined by the modified colorimetric method of Denizot with the use of MTT dye [22]. IR spectra of polymer films were recorded with IFS 48 spectrophotometer (Bruker) and UV spectra - with UV VIS 8452A Hewlett Packard spectrophotometer. The intensity of incident radiation at  $\lambda = 254$  nm was determined by the use of VLX-3W radiometer with C-254 sensor (Vilber Lourmat, France). The viscosity of the polymer solutions in chloroform were measured with a capillary viscometer at  $30 \pm 0,1^\circ\text{C}$ .

## Results and discussion

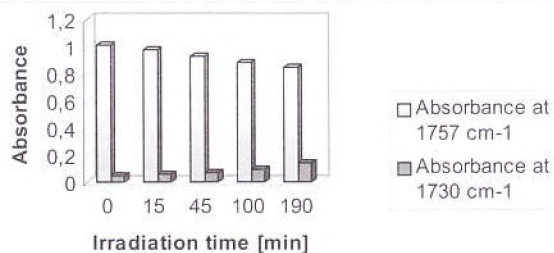
PLLA samples were prepared in the form of films of the diameter 2.0 cm and thickness 50-150  $\mu\text{m}$ . They were obtained by dissolving a weighted portion of PLLA in methylene chloride and pouring the resulting solution on to a smooth glass plate followed by the slow evaporation of solvent. The films were then conditioned in a heating chamber at  $37^\circ\text{C}$  for two days (initial films).

Prior to the experiments each polymer sample was sterilised in a laminar equipped with a low-pressure mercury lamp (Heraeus), emitting the 254 nm radiation of the intensity  $0,97 \text{ mW} \times \text{cm}^{-2}$  ( $4 \times 10^{-9}$  mole of photons  $\times \text{s}^{-1} \times \text{cm}^{-2}$ ). On the basis of the bacteriological tests it was established that the sterilisation was completed after 6 minute's irradiation of a film in the laminar.

In order to check the photochemical stability of the polymer films they were subjected to the prolonged irradiation



interferencyjnego; intensywność promieniowania padającego wynosiła  $2 \times 10^{-9}$  moli fotonów  $\times s^{-1} \times cm^{-2}$ . Widma IR filmów PLLA, zarejestrowane po różnych czasach naświetlania wskazują na obniżenie liczby estrowych grup karbonylowych z czasem ekspozycji (zmniejszenie intensywności pasma absorpcyjnego z maksimum przy  $1757\text{ cm}^{-1}$ ) oraz na równoległy wzrost absorpcji około  $1730\text{ cm}^{-1}$ , który można przypisać wzrostowi liczby karboksylowych grup końcowych [23] (por. RYS.1). Stwierdzono, że zmiany w widmie IR w wyniku absorpcji dawki promieniowania w procesie



**RYS.1. Zależność absorbancji w maksimum estrowego pasma karbonylowego,  $1757\text{ cm}^{-1}$ , i kwasowej grupy karbonylowej,  $1730\text{ cm}^{-1}$ , dla filmu PLLA naświetlanego promieniowaniem o długości fali  $\lambda = 254\text{ nm}$ .**

**FIG.1. The dependence of the absorbance at the maximum of ester carbonyl band,  $1757\text{ cm}^{-1}$ , and acidic carbonyl band,  $1730\text{ cm}^{-1}$ , for PLLA film irradiated with light at  $\lambda = 254\text{ nm}$ .**

sterylizacji prowadzonej przez autorów są do zaniedbania. Należy jednak zauważyć, że długotrwałe naświetlanie promieniowaniem w zakresie UV z pewnością prowadzi do zmian chemicznych w próbkach PLLA, tak więc posługując się tą metodą sterylizacji należy odpowiednio do materiału dobrać czas naświetlania.

Zawiesinę makrofagów w RPMI 1640 z 10% FCS o początkowym stężeniu  $5 \times 10^5$  komórek/ $cm^3$  umieszczano w dołkach płytki hodowlanej ( $2\text{ cm}^3$  na każdy dołek.) Komórki hodowano w atmosferze powietrza (95%) i  $CO_2$  (5%) w obecności lub nie (kontrola) filmów PLLA. Hodowlę prowadzono przez 14 dni; każdego dnia pobierano  $1\text{ cm}^3$  supernatantu, a hodowlę uzupełniano dodając  $1\text{ cm}^3$  medium hodowlanego RPMI+FCS.

W celu określenia zmian ilości karbonylowych grup estrowych w filmach PLLA poddanych działaniu komórek zarejestrowano widma IR filmów pozostających w kontakcie z medium hodowlanym i z zawiesiną makrofagów przez 0,7 i 14 dni. Na RYS.2 przedstawiono zależności znormalizowanej absorbancji przy liczbie falowej  $1757\text{ cm}^{-1}$  (stosunek absorbancji po czasie  $t$  kontaktu z RPMI+FCS lub z zawiesiną komórek do absorbancji filmu początkowego,  $(A_{1757,t} / A_{1757,t=0})$  od czasu hodowli. Znormalizowana absorbancja maleje nieznacznie z czasem inkubacji w płynie hodowlanym. Obniżenie absorbancji jest wyraźnie wzmożone w obecności makrofagów. Świadczy to o przyspieszeniu procesu degradacji PLLA przez te komórki.

Proces degradacji śledzono również prowadząc pomiary lepkości serii roztworów próbek PLLA w chloroformie. Próbkę polimeru po określonym czasie inkubacji rozpuszczano w  $CHCl_3$  i sporządzano następnie serię roztworów o coraz większym rozcieńczeniu. Wyznaczano graniczną liczbę lepkościową  $[\eta]$  i na podstawie równania Marka-Houwinka:

$$[\eta] = K \bar{M}_v^\alpha,$$

gdzie  $K = 5,45 \times 10^{-4}\text{ dl/g}$  i  $\alpha = 0,73$  [24],

in a photochemical stand. The irradiation was carried out in air at atmospheric pressure with light at  $\lambda = 254\text{ nm}$ , extracted from the spectrum of an ASH400 medium pressure mercury lamp with the aid of a Zeiss interference filter. The incident radiation intensity was  $2 \times 10^{-9}$  mole of photons  $\times cm^{-2} \times s^{-1}$ . The IR spectra of the PLLA film, recorded after different times of irradiation, reveal the decrease in the number of ester carbonyl groups (the absorbance peak at  $1757\text{ cm}^{-1}$ ) followed by the increase of absorption at about  $1730\text{ cm}^{-1}$ , which can be attributed to the formation of acidic carbonyl end groups [23] (see FIG.1). The changes in the IR spectrum after absorbing the radiation dose in the laminar during the sterilisation were found to be negligible. It should be pointed out, however, that the prolonged exposure on the UV radiation certainly leads to the chemical changes in polymer samples and one should be careful when choosing the time of sterilisation.

The macrophage suspension in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FCS was placed in 12-well flat-bottom cell culture plates ( $2\text{ cm}^3$  in each well) and cultured at  $37^\circ\text{C}$  in the atmosphere of air (95%) and  $CO_2$  (5%). The initial cell concentration was  $5 \times 10^5$  cells/ $cm^3$ . PLLA films were placed at the bottom of the wells; the control experiments were performed without PLLA. The cultures were carried out for 14 days; every day  $1\text{ cm}^3$  of the supernatant was taken and the culture was supplemented by  $1\text{ cm}^3$  of RPMI+FCS medium.

IR spectrophotometry was applied in order to observe the changes in ester carbonyl concentration in PLLA films. The spectra were measured after 0, 7 and 14 days of PLLA contact with the culture medium and with the suspension of macrophages. The ratios of the absorbances at  $1757\text{ cm}^{-1}$  for the film after the treatment during the time  $t$  to the absorbance of the initial film ( $t=0$ ) in the function of time,  $A_{1757,t} / A_{1757,t=0}$ , (see FIG.2) decrease with the time of the incubation. This fact indicates the consumption of carbonyl ester groups which is enhanced by the macrophages present in the system.

The process of degradation was monitored via the measurements of the viscosity of the series of solutions of PLLA in chloroform. The values of viscosity were then extrapolated to zero concentration in order to determine the intrinsic viscosities,  $[\eta]$ . The molecular weights of initial PLLA films as well as the films remaining in contact with culture medium and macrophage suspension in culture medium for different times were calculated from the Mark-Houwink equation:

$$[\eta] = K \bar{M}_v^\alpha,$$

where  $K = 5.45 \times 10^{-4}\text{ dl/g}$  and  $\alpha = 0.73$  [24]. For moderate degrees of degradation the following relationship between and could be applied [25]:

$$\bar{M}_n^\alpha = \bar{M}_v^\alpha / \Gamma(2 + \alpha)$$

where  $\Gamma(x)$  is available in tables. The values of the ratios

$$\bar{M}_{n,t} / \bar{M}_{n,t=0}$$

are depicted in FIG.2. It can be concluded that the process of PLLA degradation in the absence of Mf is slow, but the macrophages promote the process of main chain scission leading to the decrease in the molecular weight of the polymer.

The formation of lactic acid during the process of PLLA degradation was monitored with the aid of Sigma diagnostic procedure. Lactate was determined spectrophotometrically in supernatants after 2, 5, 6, 7, 12, and 14 days of the incubation of the macrophages. The obtained results are presented in FIG.3. The estimated concentrations of lactic acid in control probes (PLLA in the culture medium without macrophages) were negligible (up to  $0.7\text{ mmol/dm}^3$ ). It was



określono masę molową polimeru. Dla niezbyt wielkiego stopnia degradacji można zastosować [25] zależność:

$$\bar{M}_n^\alpha = \bar{M}_v^\alpha / \Gamma(2 + \alpha)$$

( $\Gamma(x)$  jest dostępne w tablicach). Wartości

$$\bar{M}_{n,t} / \bar{M}_{n,t=0}$$

dla różnych czasów inkubacji zestawiono na RYS.2. Z przedstawionych danych wynika, że proces degradacji w nieobecności makrofagów jest wolny oraz że makrofagi przyspieszają proces pękania głównego łańcucha polimerowego, co prowadzi do obniżenia masy molowej polimeru.

Tworzenie kwasu mlekowego w badanych układach badano przy pomocy procedury diagnostycznej Sigma. Stężenie mleczanu w supernatantach oznaczano spektrofotometrycznie po 2,5,6,7,12,i 14 dniach hodowli makrofagów. Wyniki badań przedstawiono na RYS.3. Stężenia oznaczone dla próbek kontrolnych (PLLA w medium hodowlanym bez makrofagów) są zaniedbywalnie małe (do 0,7 mmol/dm<sup>3</sup>). Stwierdzono jednak, że stężenie kwasu mlekowego w supernatantach pochodzących z hodowli makrofagów inkubowanych bez obecności PLLA jest wysokie, co wynika z uwalniania endogennego kwasu przez same makrofagi. Poczynając od 7 dnia hodowli poziom kwasu mlekowego w supernatantach uzyskanych z hodowli makrofagów w obecności PLLA przewyższa wartość kontrolną. Wynik ten wskazuje na odszczepianie kwasu mlekowego z polimeru. W celu sprawdzenia biogodności układu PLLA+Mf oznaczano żywotność makrofagów hodowanych z PLLA po 2, 5, 6, 7, 12 i 14 dniach hodowli. Wyniki przedstawiono (RYS.4) jako procent żywych komórek obecnych na filmach PLLA w porównaniu z ilością makrofagów hodowanych bez PLLA (uznaną za 100%). Wykazano, że żywotność makrofagów hodowanych w obecności PLLA oznaczona od drugiego do czternastego dnia eksperymentu wynosi około 95% żywotności komórek kontrolnych. Można więc stwierdzić, że PLLA nie wpływa na przeżywalność komórek i proces ich podziałów.

Wśród wielu czynników uwalnianych przez pobudzone makrofagi największe spektrum działania mają TNF $\alpha$  i IL-6, które odgrywają istotną rolę w regulacji stanu zapalnego [20]. Stężenie tych cytokin wytwarzanych w czasie hodowli można uznać za miarę pobudzenia makrofagów jakie ma miejsce w odczynie zapalnym. Stężenia TNF $\alpha$  i IL-6 w supernatantach z hodowli Mf w obecności PLLA po 24 godzinach inkubacji zestawiono w tabeli poniżej.

Oprócz hodowli kontrolnej (same komórki) i hodowli na PLLA, makrofagi hodowano w obecności lipopolisacharydu (PLS) będącego silnym aktywatorem produkcji prozapalnych cytokin.

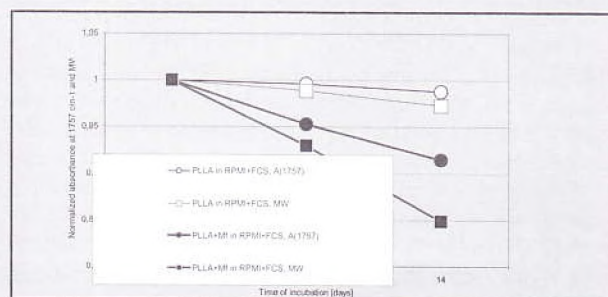
Jak widać z TABELI folie z PLLA bardzo nieznacznie wzmagają zdolność makrofagów do produkcji IL-6 i TNF- $\alpha$ .

	TNF $\alpha$ [pg/ml]	IL-6 [pg/ml]
Mf (bez / without PLLA)	240 $\pm$ 35	300 $\pm$ 64
Mf + PLLA	400 $\pm$ 42	600 $\pm$ 29
Mf + LPS (próba kontrolna / control sample)	5100 $\pm$ 105	6200 $\pm$ 95

## Wnioski

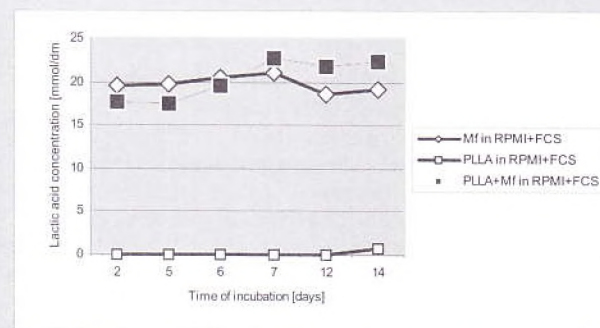
Biorąc pod uwagę uzyskane wyniki można stwierdzić, że w czasie przedstawionych eksperymentów

- degradacja PLLA w nieobecności makrofagów jest bardzo wolna, graniczna liczba lepkościowa wyznaczona dla PLLA inkubowanego w czystym płynie hodowlanym



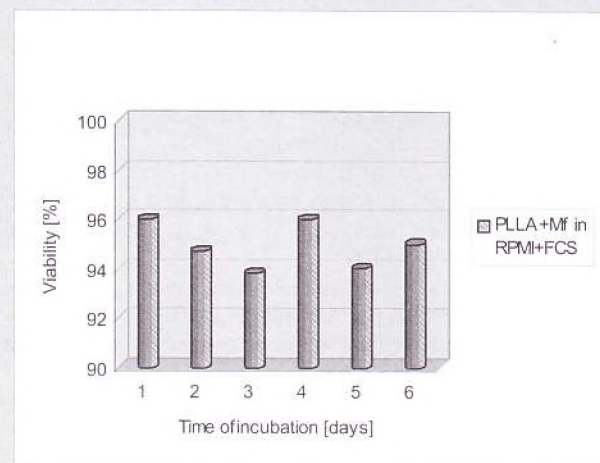
RYS.2. Stosunek absorbancji  $A_{1757,t} / A_{1757,t=0}$ , gdzie  $A_{1757,t=0}$  jest absorbancją wyjściowego filmu i  $A_{1757,t}$  jest absorbancją filmu po czasie inkubacji  $t$  jako funkcja czasu inkubacji.

FIG.2. The ratio of absorbances  $A_{1757,t} / A_{1757,t=0}$  where  $A_{1757,t=0}$  is the absorbance of the initial film and  $A_{1757,t}$  is the absorbance of the film after the incubation time  $t$ , as the function of time  $T$



RYS.3. Zależność stężenia kwasu mlekowego od czasu inkubacji.

FIG.3. The dependence of the concentration of lactic acid on the time of incubation.



RYS.4. Żywotność makrofagów hodowanych w RPMI+FCS w obecności PLLA. Żywotność makrofagów hodowanych w RPMI+FCS bez polimeru przyjęto za 100%.

FIG.4. The viability of macrophages incubated in RPMI+FCS in the presence of PLLA. The viability of macrophages cultured in RPMI+FCS medium without the polymer was taken as 100%.

found, however, that the concentration of lactic acid in supernatants originating from the macrophage cultures without PLLA was high which was attributed to the release of the endogenic acid by macrophages themselves. Starting from 7 days of incubation, the level of lactic acid in supernatants obtained from the cultures of Mf on PLLA discs is higher than the control value. This result confirms the release of lactic acid from the polymer. In order to check



jest porównywalna z lepkością graniczną wyjściowego polimeru,

- proces degradacji PLLA jest bardziej wzmożony w obecności makrofagów; potwierdzają to badania viskozymetryczne i analiza widm IR,
- wydzielanie kwasu mlekowego w trakcie procesu degradacji jest nieznaczne lecz na otrzymane wyniki wpływa fakt uwalniania kwasu mlekowego przez same makrofagi,
- folie z PLLA nie indukują produkcji prozapalnych cytokin TNF $\alpha$  i IL-6 przez makrofagi.

Podsumowując można stwierdzić, że proces degradacji PLLA jest przyspieszany przez makrofagi oraz że poli(L-kwas mlekowy) i makrofagi tworzą układy biogodne.

## Piśmiennictwo

## References

- [1] B. C. Benicewicz, P. K. Hopper. *J. Bioact. Compat. Polym.* 6 (1991) 64.
- [2] A. R. Katz, R. J. Turner. *Surg. Gynecol. Obstet.* 131 (1970) 701.
- [3] E. Hirvensalo, E. K. Partio, O. Böstman. *Br. J. Surg.* 80 (1993) S 71.
- [4] H. P. Von Schroeder, M. Kwan, D. Amiel, R. D. Coutts. *J. Biomed. Mater. Res.* 25 (1991) 329.
- [5] L. G. Cima, J. P. Vocanti, C. Vocanti, D. E. Ingber, D. Mooney, R. Langer. *J. Biomech. Eng.* 113 (1991) 143.
- [6] N. Ashammakhi, P. Rokkanen. *Biomaterials* 18 (1997) 3.
- [7] R. Langer, J. P. Vocanti, *Science* 260 (1993) 920.
- [8] I. Grizzi, H. Garreau, S. Li, M. Vert. *Biomaterials* 16 (1995) 305.
- [9] S. J. Holland, B. J. Tighe, P. L. Gould. *J. Contr. Rel.* 4 (1986) 155.
- [10] H. Pistner, D. R. Bendix, J. Muehling, J. F. Reuther. *Biomaterials* 14 (1993) 291.
- [11] H. A. Recum, R. L. Cleek, S. G. Eskin, A. G. Mikos. *Biomaterials* 16 (1995) 441.
- [12] S. Li, H. Garreau, M. Vert. *J. Mater. Sci.:Mater. In Med.* 1 (1990) 123.
- [13] S. Li, S. Mc Carthy. *Biomaterials* 20 (1999) 35.
- [14] M. Vert, S. M. Li, G. Spenlehauer, P. Guerin. *J. Mater. Sci.: Mater. In Med.* 3 (1992) 432.
- [15] M. Vert, J. Mauduit, S. Li. *Biomaterials* 15 (1994) 1209.
- [16] H. Pistner, H. Stauforth, R. Gutwald, J. Muehling, J. Reuther, C. Michael. *Biomaterials* 15 (1994) 439.
- [17] T. E. Otto, J. K. Nulend, P. Patka, E. H. Burger, H. J. Haarman. *J. Biomed. Mater. Res.* 32 (1996) 512.
- [18] A. Park, L. G. Cima. *J. Biomed. Mater. Res.* 31 (1996) 117.
- [19] B. Saad, G. Ciardelli, S. Matter, M. Welti, G. K. Uhschmid. *J. Biomed. Mat. Res.* 31 (1996) 429.
- [20] G. J. Darlington, D. R. Wilson, B. Lachman. *J. Cell. Biol.* 103 (1986) 787.
- [21] J. A. Gloster, P. Harris. *Clin. Chim. Acta* 7 (1962) 206f.
- [22] . Denizot, R. Lang. *J. Immunol. Methods* 89 (1986) 271.
- [23] L. J. Bellamy. *The Infra-Red Spectra Of Complex Molecules*, Published By Chapman And Hall Ltd. London Ec4p4ee .
- [24] A. Shindler, D. Harper. *J. Polym. Sci., Polym.Chem.Edn.* 17 (1979) 2593.
- [25] P. Meares "Polymers: Structure And Bulk Properties " D Van Nostrand Comp.Ltd., London 1965, P.66.

the biocompatibility of PLLA + Mf system the viability of macrophages was estimated. The percentage of living cells was determined after 2, 5, 6, 7, 12 and 14 days of macrophage incubation with PLLA and without the polymer. The results were demonstrated (see FIG.4) as the percentage of viable cells present on PLLA films in comparison with the Mf cultured without the polymer (taken as 100%). It was found that the viability of macrophages cultured in the presence of PLLA is of about 95% of the control value during the time of experiments. Therefore it can be concluded that PLLA does not affect the process of cellular division and viability.

Among many factors released by the activated macrophages, TNF $\alpha$  and IL-6 have the broadest spectrum of action on the surrounding tissues and are important in the regulation of the inflammation process [20]. Therefore the concentration of TNF $\alpha$  and IL-6 was assumed to evaluate the degree of Mf activation. Macrophages were cultured alone (control), with PLLA films and with lipopolysaccharide (LPS) - a strong inducer of synthesis and secretion of cytokines. TNF $\alpha$  and IL-6 concentrations in supernatants taken from the cultures after 24 hours of incubation are given in the TABLE below.

It can be noticed that the activation of macrophages leading to the production of IL-6 and TNF $\alpha$  very low.

## Conclusions

Taking into account the above presented results one can conclude that during the time of the experiments:

- PLLA degradation in the absence of macrophages is very slow; the intrinsic viscosity of PLLA in the culture medium alone is comparable to that of the initial polymer.
- The process of PLLA degradation is more pronounced in the presence of macrophages; this was confirmed by the viscosity measurements and the analysis of IR spectra of PLLA films treated with Mf suspension.
- The release of lactic acid during the process of degradation is not of a great importance, but the results are affected by the secretion of endogenic lactic acid by macrophages themselves.
- The viability of macrophages remaining in contact with PLLA is satisfactory. The cells divide and metabolise correctly.
- PLLA films do not induce the production of inflammatory cytokines TNF $\alpha$  and IL-6 by macrophages.

Summing up we can conclude that the process of degradation of PLLA is promoted by the macrophages and that poly(L-lactic acid) films and macrophages form the biocompatible systems.